

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790864

研究課題名（和文）がん特異的酢酸産生代謝を標的とした分子イメージングに関する基礎研究

研究課題名（英文）Study on molecular imaging for tumor-specific acetate metabolism

研究代表者

吉井 幸恵（YOSHII YUKIE）

福井大学・高エネルギー医学研究センター・助教

研究者番号：10397242

研究成果の概要：本研究では、がん診断を目的とした新規「分子イメージング」法の開発を目指し、その基盤となるがん特異的代謝に関する研究を行った。その結果、（１）がん細胞は細胞質性 Acetyl-CoA synthetase（ACSS2）によって触媒される特異的酢酸産生反応を有すること、（２）ACSS2 による代謝は低酸素環境下で亢進すること、（３）ACSS2 代謝活性を放射性酢酸トレーサーでモニターできることを明らかにした。こうした発見は、がん特異的代謝を標的としたがん診断法を開発する上で有用な情報を提供すると考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2007年度	2,700,000	0	2,700,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
総 計	3,200,000	150,000	3,350,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：画像診断学（含放射線診断学、核医学）、腫瘍酢酸イメージング

1. 研究開始当初の背景

「分子イメージング」研究

がんの早期画像診断および機能的画像診断の手法として、「分子イメージング」が必要不可欠になっている。分子イメージングとは、細胞が生きたままの状態、生体内分子の挙動を画像化し、疾患を発見しようとする手法である。本邦、米国においても近年、分子イメージング分野の研究は隆盛してきており、医学・生物学の重点項目として推進されてい

る。

がんの分子イメージング技術の進展には、がん細胞の特性に対する生物学的知見の蓄積が必要不可欠である。これまでに、がん細胞は特異的に活発な糖代謝を行うことが知られている。こうしたがんの代謝的特徴は、がん診断の強力なツールである FDG-PET（ ^{18}F デオキシブドウ糖－陽電子放射断層撮影法）に応用されている。

2. 研究の目的

一方、がん細胞がいかにして取り込んだ糖を代謝するのかに関しては謎が多い。がん細胞は、通常細胞に比べ、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化活性が低く、嫌氣的解糖が活発になっている。しかしながら、我々のこれまでのデータは、解糖によって取り込まれた糖は、必ずしも乳酸産生の用いられていないことを示している。このことは言い換えると、基礎代謝においてがん細胞は糖を水・乳酸以外の他の最終生成物に変換する経路を有していることを意味する。申請者のこれまでの研究により、がん細胞は特異的に酢酸産生を行い、この過程には細胞質性 Acetyl-CoA synthetase (ACSS2) が関与していることが示唆されている。そこで、本研究では、**がん特異的酢酸代謝過程の解明、がん特異的酢酸代謝を標的とした分子イメージング法の開発を最終的な目的として、(1) がん特異的酢酸産生過程の生物学的機序、(2) *in vivo* での酢酸産生過程の役割、(3) がん特異的酢酸代謝イメージングの可能性について検討した。**

3. 研究の方法

(1) がん特異的酢酸産生過程の生物学的機序

多種がん細胞における常酸素下及び低酸素下の酢酸産生量及びACSS2の発現を調査した。具体的には、マウス由来がん細胞 (lung carcinoma, LLC1 (LLC); melanoma, B16; colon carcinoma, Colon-26 (Colon); mammary carcinoma, C127I) 及びコントロールとして正常細胞 (fibroblast, BALB/3T3 clone A31 (3T3)) を用いて、その代謝産物の測定を行った。まず、24-well plate を用い、1 well あたり 5×10^4 細胞を 1 ml の Dulbecco's modified Eagle's (DME) 培地 (10 % Fetal bovine serum, antibiotics 添加) 中、常酸素条件下 (CO_2 培養庫, 5% CO_2 in air, 37°C) で、24h 前培養した。その後、新たな DME 培地に入れ替え、常酸素条件下及び低酸素条件下 (Personal Multi Gas Incubator [Astec], 1.2% O_2 , 93.8% N_2 and 5% CO_2) で 24h 培養した。培養培地を回収し、イオンクロマトグラフィー法 [ion chromatography (Shimadzu); ICsep ION-300 ion-exclusion column (300×7.8 mm i.d., Transgenomic); flow rate 0.4 ml/min; temperature 70°C ; eluent 0.0085 N H_2SO_4 ; ultraviolet detector (Shimadzu) 210 nm] を用い、有機酸や糖の含有を大まかに確認した後、F-kit (R-Biopharm AG) を用いて、代謝物の定量解析を行った。上記の手順と同様に常酸素条件下及び低酸素条件下で培養した細胞 (LLC, B16, Colon, C127I, 3T3) ($1-6 \times 10^6$ cells) を回収し、Micro-to-Midi total

RNA purification system (Invitrogen Life Technology) を用いて RNA の精製を行った。これを用い、リアルタイム定量 RT-PCR 法を用いて遺伝子の発現解析を行った。解析には、comparative C_T method を用い、内部標準には β -actin を用いた。また、反応は、ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) を用いて行い、反応試薬には Taqman One-Step RT-PCR Master Mix reagents 及び Taqman gene expression assays (Applied Biosystems) を用いた。

また、ACSS2 の酢酸産生への関与をより明確にするため、RNA 干渉 (RNAi) 法を用い、ACSS2 ノックダウン実験を行った。まず、細胞内で安定な RNAi を起こさせるために、Mission lentiviral transduction particles (SHVRS-NM 019811; Sigma) を用いて遺伝子導入を行い、Acss2 ノックダウンがん細胞株を作成した。また、コントロールには Non-targeting shRNA (SHC002V, Sigma) を用いた。Puromycin を用い、安定導入がん細胞を selection した。リアルタイム定量 RT-PCR 法を用いて Acss2 の遺伝子発現の抑制を確認した。こうして得られた RNAi 細胞株について、上記の方法で酢酸産生を調べた。

また、RNAi 細胞株を用いて、ATP 量、細胞増殖能、低酸素生存、細胞死 (アポトーシス) の誘導などの項目について検討を行った。低酸素生存は、上記の手順で作成した RNAi 細胞株を用い、以下の方法で行った。まず、24-well plates を用い、1well あたり 5×10^5 細胞を 1 ml DME 培地中に播き、24 h 常酸素条件下で培養した。その後、培地を交換し、低酸素条件に移した (0day)。その後、1 日おきにあらかじめ低酸素処理をした DME 培地に交換し、7 日間培養を行った。細胞は、1 日おきに trypan blue dye-exclusion method により細胞数を計測した。これらのデータに基づき、がん特異的酢酸産生過程の詳細について検討した。

(2) *in vivo* での酢酸産生過程の役割

(1) で作成した ACSS2 ノックダウンがん細胞をヌードマウスの植える移植実験を行った。実験には 6 週齢 BALB/c Slc-nu/nu male nude mice (Japan SLC) を用いた。マウス大腿部皮下に PBS に懸濁した RNAi がん細胞 [8×10^6 (Colon) 又は 1×10^7 (LLC, B16, C127I)] をそれぞれ移植した。腫瘍サイズは 3 日おき 12 日間測定した。腫瘍体積 (mm^3) は (長径) \times (短径) $^2 \times (6/\pi)$ として求めた。なお、動物実験は、福井大学動物実験規程に従って行われた。

(3) がん特異的酢酸代謝イメージングの可能性

ACSS2 は、酢酸と Acetyl-CoA との間の反応

を可逆的に触媒していると考えられた。そこで、放射性酢酸トレーサーを用い、多種がん細胞において常酸素下、及び低酸素下における放射性酢酸トレーサーの取り込みと ACS2 の発現について検討した。また、ACS2 ノックダウンがん細胞株を用い、放射性酢酸トレーサーの取り込みを検討した。これにより、酢酸イメージングの基礎的な機序について検討した。まず、細胞を 24-well plates に播き、24h 前培養した。このとき、増殖速度を考慮し、1well あたり LLC, B16, Colon は 5×10^4 細胞, C127I は 8×10^4 細胞, 3T3 は 1×10^5 細胞とした。RNAi 細胞は、 1×10^5 細胞播種した。細胞は 37kBq [14 C] 酢酸添加 DME 培地に交換後 1h 常酸素下で培養した。一方、低酸素条件下の実験では、前培養後にさらに 2h 又は 6h 低酸素処理を施した後、37kBq [14 C] 酢酸添加培地に交換後、1h 低酸素下で培養した。その後、それぞれにつき培地を除去し、氷冷した PBS で 2 回洗った後、0.5ml 0.2N NaOH を加え、2h 室温で細胞を溶解させた。これに 9.5ml ACSII (Amersham) を加え、液体シンチレーションカウンター (LSC-5000, Aloka) を用いて放射能を測定した。

4. 研究成果

(1) がん特異的酢酸産生過程の生物学的機序

多種がん細胞における常酸素下及び低酸素下の酢酸および乳酸産生量を図 1 に示す。

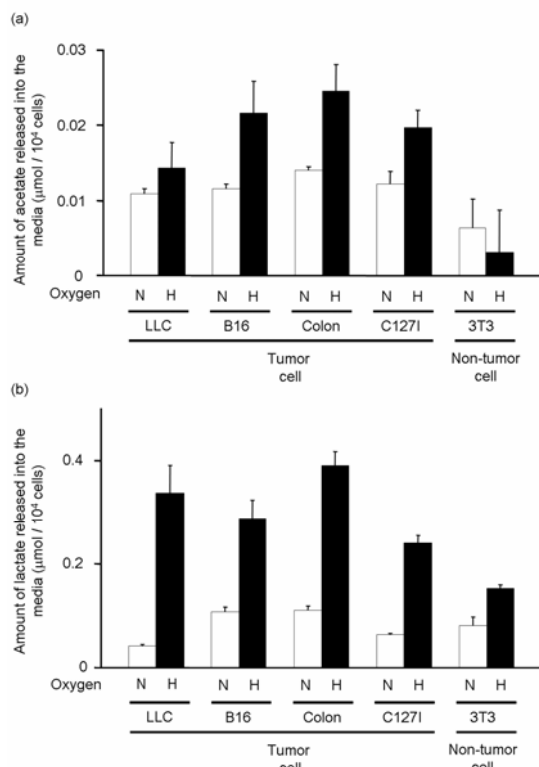


図 1. 常酸素下及び低酸素下の酢酸および乳酸産生量

がん細胞は正常細胞に比べ、多く酢酸を産生することが明らかとなった。また、がん細胞は低酸素条件下におかれるとさらに多くの酢酸を産生することが示された。一方、正常細胞は、低酸素条件下でほとんど酢酸を産生しなかった。一方、乳酸産生は、嫌氣的乳酸発酵亢進のため、増加している。

ACS2 の発現を図 2 に示す。

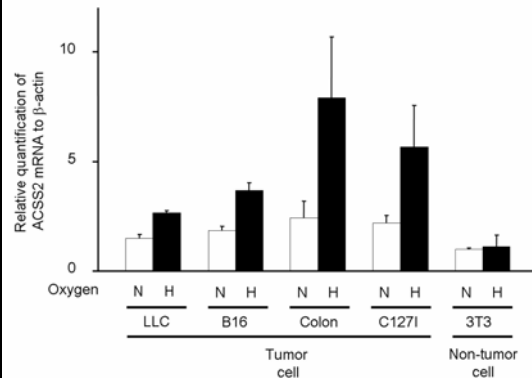


図 2. がん細胞における ACS2 発現

様々な酢酸代謝に関係が予想される酵素の遺伝子発現を調べたところ、細胞質性の acetyl-coenzyme A (CoA) synthetase 2 (Acss2) ががん細胞で高発現で、さらに低酸素下で発現が向上することが明らかとなった。その発現パターンは、酢酸産生のパターンと類似していた。

ACS2 ノックダウン実験の結果を、図 3、4 に示す。

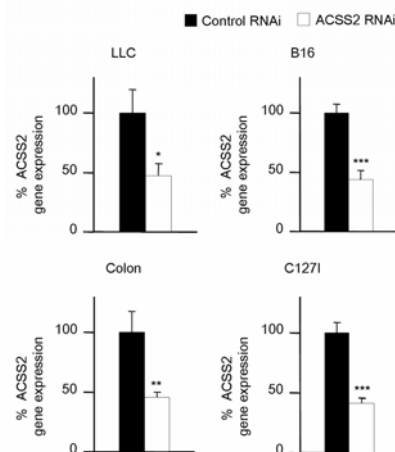


図 3. ACS2 ノックダウン

本法により、Acss2 の遺伝子発現は、すべてのがん細胞株で抑制され、それに伴い酢酸産生が減少することが明らかとなった。Acss2 は、一般に酢酸を細胞内に固定する酵素だと考えられてきた。一方、酵素化学的には、 $[\text{ATP} + \text{acetate} + \text{CoA} \leftrightarrow \text{AMP} + \text{diphosphate} + \text{acetyl-CoA}]$ という可逆反応を触媒することも報告されている。本実験から、がん細胞

において、acetyl-CoA を酢酸に変換する Acss2 の逆反応、つまり酢酸エネルギー産生反応が見られる事が明らかとなった。

また、低酸素下で、ACSS2 ノックダウンがん細胞の生存が阻害されること (図 5)、その過程で、アポトーシスが起きていることなども確認された。

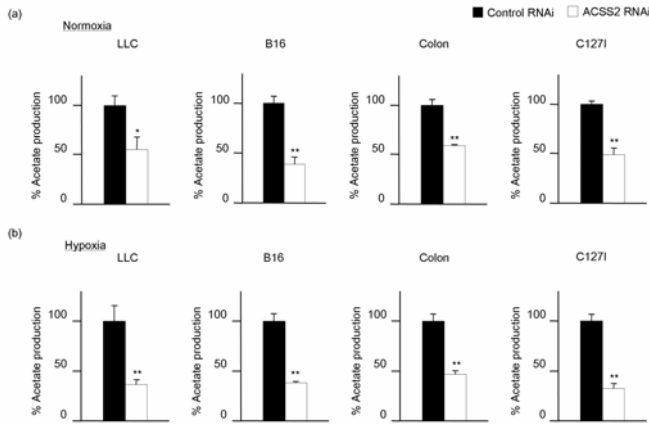


図 4. がん細胞における ACSS2 ノックダウンに伴う酢酸産生の減少

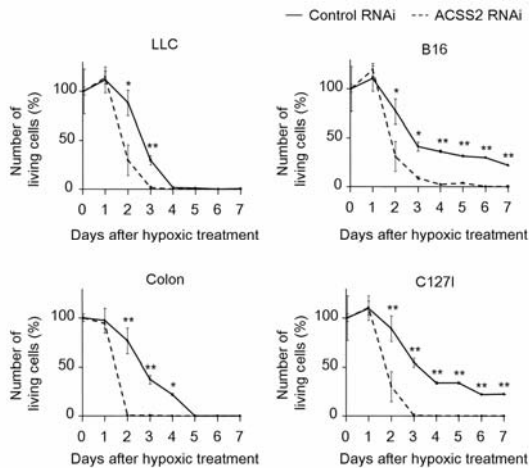


図 5. ACSS2 ノックダウンによりがん細胞の低酸素生存が抑制される

(2) *in vivo*での酢酸産生過程の役割

*in vivo*での腫瘍増殖における酢酸産生過程の役割を明らかにする目的で、ACSS2 ノックダウン細胞株のマウス移植実験を行った。結果を、図 6 に示す。

ACSS2 ノックダウン腫瘍はコントロール腫瘍よりも増殖が遅かったため、ACSS2 は腫瘍の増殖に重要な役割を果たしていると考えられる。

(3) がん特異的酢酸代謝イメージングの可能性

放射性酢酸トレーサーの取り込みにおける ACSS2 の役割を ACSS2 ノックダウンがん細胞を用いて検討した。Acss2 RNAi 細胞では、Acss2 抑制に応じ、放射性酢酸トレーサーの取り込みが減少していた (図 7)。このことから、Acss2 は放射性酢酸トレーサーの取り込みにも関与することが明らかとなった。

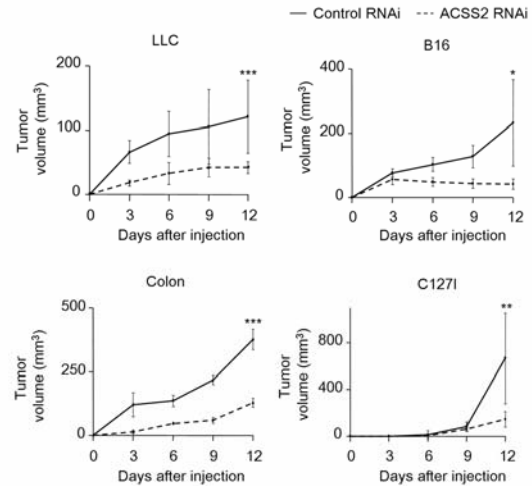


図 6. ACSS2 ノックダウンにより腫瘍増殖が抑制される

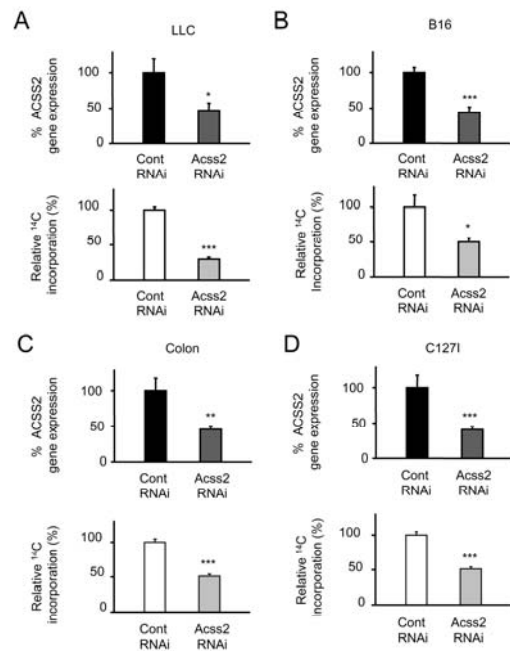


図 7. ACSS2 は酢酸トレーサー取り込みに関与する

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

- ① Yukie Yoshii, Takako Furukawa, Hiroshi Yoshii, Tetsuya Mori, Yasushi Kiyono, Atsuo Waki, Masato Kobayashi, Tetsuya Tsujikawa, Takashi Kudo, Hidehiko Okazawa, Yoshiharu Yonekura, Yasuhisa Fujibayashi. Cytosolic acetyl-CoA synthetase affected tumor cell survival under hypoxia: the possible function in tumor acetyl-CoA/acetate metabolism. *Cancer Science* (2009) in press. 査読有

〔学会発表〕（計 6 件）

国際学会

- ①[Oral presentation] Yukie Yoshii, Takako Furukawa, Hiroshi Yoshii, Tetsuya Mori, Masato Kobayashi, Yasushi Kiyono, and Yasuhisa Fujibayashi. Tumor acetate imaging: a new paradigm for understanding tumor-specific hypoxic metabolism. The Society of Nuclear Medicine (SNM) annual meeting, 2008.6.14-18 (New Orleans, Louisiana, USA)

- ②[Poster presentation] Yukie Yoshii, Takako Furukawa, Hiroshi Yoshii, and Yasuhisa Fujibayashi. Is acetate a metabolic imaging marker of tumors under hypoxia? The Academy of Molecular Imaging and the Society for Molecular Imaging (AMI/SMI) Molecular Imaging Joint Conference, 2007.9.8-11 (Providence, Rhode island, USA)

- ③[Oral presentation] Yukie Yoshii, Takako Furukawa, Hiroshi Yoshii, and Yasuhisa Fujibayashi. Acceleration of tumor acetate uptake under hypoxia: a new perception of tumor imaging by acetate. The Society of Nuclear Medicine (SNM) annual meeting, 2007.6.2-7 (Washington DC, USA)

- ④[Poster presentation] Yukie Yoshii, Takako Furukawa, Hiroshi Yoshii, Tetsuya Mori, and Yasuhisa Fujibayashi. Tumor-specific fermentative pathway for energy production: a possible target for tumor imaging. The Society of Nuclear Medicine (SNM) annual meeting, 2007.6.2-7 (Washington DC, USA)

国内学会

- ⑤〔口頭発表〕吉井幸恵, 古川高子, 吉井裕, 藤林康久. 悪性腫瘍を標的とした酢酸代謝イメージングの新展開. 第47回日本核医学会学術総会, 2007.11.4-6 (仙台)

- ⑥〔口頭発表〕吉井幸恵, 古川高子, 吉井裕, 森哲也, 藤林康久. 癌特異的な酢酸産生発酵過程—癌分子イメージング研究から生まれた新知見. 第2回日本分子イメージング学会, 2007.5.28-29 (福井)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：がん特異的な酢酸代謝を標的としたがんバイオマーカー・検査方法・治療剤

発明者：吉井幸恵, 藤林康久, 古川高子, 清野泰, 森哲也, 吉井裕.

権利者：福井大学

種類：特許出願

番号：特願 2008-120023

出願年月日：2008 年 5 月 1 日

国内外の別：国内

〔その他〕

【産学連携・講演】吉井幸恵. がん特異的な酢酸代謝を標的としたがんバイオマーカー・診断法・治療法. 福井大学・科学技術振興機構 (JST) 主催 新技術説明会. 2008.8.22 (東京)

【記事掲載】日経バイオテクノロジージャパンに記事掲載「福井大ががん特異的な酢酸代謝経路を発見、新規バイオマーカーの可能性」2008.8.26

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉井 幸恵 (YOSHII YUKIE)

福井大学・高エネルギー医学研究センター・助教

研究者番号：10397242